

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Caprinos e Ovinos
Ministério da Agricultura, Pecuária e
Abastecimento**

Documentos 107

On line

Lentiviroses em Pequenos Ruminantes: Principais Métodos de Diagnóstico

Raymundo Rizaldo Pinheiro

Alice Andrioli

Lúcia Helena Sider

Lauana Borges Santiago

Eduardo Luiz de Oliveira

Ana Lídia Madeira de Sousa

Francisco Selmo Fernandes Alves

Juliano Cezar Minardi da Cruz

Embrapa Caprinos e Ovinos

Sobral, CE

2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos e Ovinos

Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 - Caixa Postal 145

CEP: 62010-970 - Sobral-CE

Fone: (0xx88) 3112-7400 - Fax: (0xx88) 3112-7455

Home page: www.cnpc.embrapa.br

Sac: www.cnpc.embrapa.br/formulariosac.php

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Olivardo Facó

Secretário-Executivo: Alexandre César Silva Marinho

Membros: Carlos José Mendes Vasconcelos, Tânia Maria Chaves Campelo, Luciana Cristine Vasques Villela, Antônio César Rocha Cavalcante, Sérgio Cobel da Silva, Adriana Brandão Nascimento Machado, Manoel Everardo Pereira Mendes e Geny Rodrigues

Supervisor editorial: Alexandre César Silva Marinho

Revisor de texto: Carlos José Mendes Vasconcelos

Normalização bibliográfica: Tânia Maria Chaves Campelo

Editoração eletrônica: Comitê de Publicações

1ª edição on line (2012)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Caprinos e Ovinos**

Lentivirose de pequenos ruminantes : principais métodos de diagnóstico /

Raymundo Rizaldo Pinheiro ... [et al.]. — Dados eletrônicos. — Sobral : Embrapa Caprinos e Ovinos, 2013.

42 p. : il. — (Documentos / Embrapa Caprinos e Ovinos, ISSN 11676-7659 ; 107).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: < <http://www.cnpc.embrapa.br/publicacoes/>>.

Título da página da Web (acesso em 10 dez. 2012).

1. Caprino – Doença animal – Diagnóstico. 2. Ovino – Doença animal – Diagnóstico. 3. Doença animal – Virose. II. Pinheiro, Raymundo Rizaldo. III. Andrioli, Alice. IV. Sider, Lucia Helena. V. Santiago, Lauana Borges. VI. Oliveira, Eduardo Luiz de. VII. Alves, Francisco Selmo Fernandes. VIII. Cruz, Juliano Cezar Minardi da. IX. Título. X. Série.

CDD 636.0896925 (21. ed.)

Autoria

Raymundo Rizaldo Pinheiro

Méd. Vet., D. SC., Pesquisador da Embrapa
Caprinos e Ovinos. Fazenda Três Lagoas, Estrada
Sobral/ Groaíras, Km 04, Caixa Postal 145, CEP-
62010-970, Sobral/CE.

E-mail: rizaldo.pinheiro@embrapa.br

Alice Andrioli

Méd. Vet., D. SC., Pesquisadora da Embrapa
Caprinos e Ovinos.

E-mail: alice.andrioli@embrapa.br

Lúcia Helena Sider

Méd. Vet., D. SC., Pesquisadora da Embrapa
Caprinos e Ovinos.

E-mail: lucia.sider@embrapa.br

Lauana Borges Santiago

Méd. Vet., M. SC., Pesquisadora da Embrapa
Caprinos e Ovinos.

E-mail: lauana.santiago@embrapa.br

Eduardo Luiz de Oliveira

Méd. Vet., M. SC., Analista da Embrapa Caprinos e
Ovinos.

E-mail: eduardo.oliveira@embrapa.br

Ana Lídia Madeira de Sousa

Graduanda em Biologia da Universidade Estadual
Vale do Acaraú

E-mail: analidiams10@yahoo.com.br

Francisco Selmo Fernandes Alves

Méd. Vet., D. SC., Pesquisador da Embrapa
Caprinos e Ovinos.

E-mail: selmo.alves@embrapa.br

Juliano Cezar Minardi da Cruz

Méd. Vet., D. SC., Bolsista de DCR da FUNCAP.

E-mail: jcminardi@yahoo.com

Apresentação

A Embrapa empreende esforços para disponibilizar soluções tecnológicas para a produção sustentável de caprinos e ovinos. O apoio à estruturação de programas de controle das principais doenças dos rebanhos nacionais é um dos desafios da agenda de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (P,D&I) para os próximos anos, sendo o desenvolvimento de testes para detecção precoce das doenças um dos primeiros passos para a oferta de soluções tecnológicas para os programas de controle. Esta é uma etapa muito importante, pois além da sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico, da frequência de sua utilização nos animais, do manejo utilizado nos rebanhos e do comprometimento dos técnicos e produtores depende o sucesso dos programas de controle de muitas doenças.

O presente documento trata de uma atualização com relação aos métodos de diagnóstico das Lentivirose de Pequenos Ruminantes. Elaborado com a pretensão de ser uma fonte de consulta para todos aqueles que lidam com a sanidade de pequenos ruminantes, especialmente técnicos e estudantes das Ciências Agrárias.

Evandro Vasconcelos Holanda Júnior
Chefe-Geral da Embrapa Caprinos e Ovinos

Sumário

Introdução	09
Diagnóstico	11
Diagnóstico Clínico - Patológico	12
Diagnóstico Laboratorial	15
Isolamento Viral	15
Microscopia Eletrônica (ME)	17
Hibridação <i>in situ</i> (HIS)	18
Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	19
Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)	22
Reação de Imunifluorescência Indireta (RIFI)	25
Imunohistoquímica (IHQ)	26
Ensaio Imunoenzimáticos	26
<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	26
<i>Dot-Blot (Dot-ELISA ou Dot-Immunoblotting)</i>	27
<i>Immunoblotting ou Western Blotting (WB)</i>	28
Comparação de Testes Sorológicos no Diagnóstico da CAE	30
Conclusão	32
Referências	33

Lentiviroses em Pequenos Ruminantes: Principais Métodos de Diagnóstico

*Raymundo Rizaldo Pinheiro, Alice Andrioli
Lúcia Helena Sider, Lauana Borges Santiago,
Eduardo Luiz de Oliveira, Ana Lídia
Madeira de Sousa, Francisco Selmo
Fernandes Alves, Juliano Cezar Minardi da
Cruz*

Introdução

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) pertencem à família *Retroviridae* e compreendem o maedi-visna vírus (MVV), isolado inicialmente de ovinos e o vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV), isolado inicialmente em caprinos. Entretanto, de forma semelhante a outros retrovírus, a maioria dos animais infectados não desenvolvem sinais clínicos e a infecção permanece subclínica (CALLADO et al., 2001; LEROUX et al., 2010).

Esses vírus apresentam-se como *virions* envelopados contendo duas moléculas idênticas de RNA e proteínas estruturais. Possuem no seu envelope uma glicoproteína importante, a gp135, e no capsídeo, a p28, que induzem a formação de anticorpos nos animais infectados. As enzimas transcriptase reversa e integrase são responsáveis pela transcrição do RNA viral em DNA e pela integração deste último ao genoma da célula hospedeira, facilitando seu escape frente ao sistema imune. Ele infecta, principalmente, monócitos e macrófagos, causando doença progressiva, lenta e fatal. A replicação desses vírus nos tecidos afetados resulta numa resposta inflamatória crônica linfocitária com formação de nódulos linfóides típicos em diversos órgãos (BRELLOU et al., 2007; PAULA et al., 2008; STRAUB, 2004).

MVV e CAEV comumente são considerados como entidades virais distintas, de acordo com a espécie na qual foram isolados inicialmente. Entretanto, nos últimos anos, evidências de transmissão interespecie têm sido levantadas (LEROUX et al., 2010). O protótipo do vírus caprino é o CAEV-Co e do ovino é o MVV-K1514. Eles são intimamente relacionados, mas geneticamente distintos. Entretanto, a classificação viral baseada na espécie hospedeira parece ser incorreta, já que diversas análises filogenéticas demonstraram grupos virais relacionados com ambas às espécies (GJERSET et al., 2007). Os estudos filogenéticos realizados com amostras de LVPR têm indicado que esses vírus devem ser considerados como *quasispécies* virais únicas que têm a capacidade de infectar tanto ovinos quanto caprinos, indicando, portanto a transmissão entre espécies (COSTA et al., 2007; PASICK, 1998).

Estudos sobre os prejuízos diretos causados por estas doenças ainda são limitados. Os resultados disponíveis indicam que, de uma maneira geral, ocorre diminuição da vida produtiva e da produção leiteira dos animais, redução na duração do período de lactação, predisposição para a ocorrência de infecções bacterianas, especialmente na glândula mamária, crescimento deficiente ou aumento da mortalidade das crias e diminuição da eficiência reprodutiva. A Artrite-Encefalite Caprina (CAE) pode promover, também, a redução dos níveis de gordura e de proteína do leite de cabras infectadas (BRITO, 2009; GREENWOOD, 1995; LILENBAUM et al., 2007; TURIN et al., 2005). Martinez-Navalon et al. (2013) observaram num estudo retrospectivo com 4543 cabras de 22 rebanhos leiteiros que animais soropositivos tinham lactações mais curtas, produziam menos leite, e este apresentava menos gordura, lactose e sólidos totais, além de apresentar contagem de células somáticas maiores que as cabras soronegativas.

Carneiro (2011) constatou, ainda, que esta enfermidade predispõe os animais à verminose gastrintestinal por *Haemonchus spp.*, elevando o número de vermifugações necessárias para o controle em até 70%, principalmente em matrizes primíparas, com consequente aumento dos custos, e reduzindo a rentabilidade da atividade para o caprinocultor.

As perdas indiretas referem-se à desvalorização dos rebanhos, reposição precoce dos animais que desenvolvem sintomas, despesas com o controle, barreiras comerciais para matrizes, reprodutores, sêmen e embriões (ANDRIOLI et al., 2002a, 2002b).

As lentivirose de pequenos ruminantes encontram-se difundidas nos rebanhos de caprinos e ovinos de diferentes países e têm sido motivo de restrições no comércio internacional dessa espécie. Diversos estudos epidemiológicos no Brasil têm demonstrado a disseminação dos LVPR em vários estados, sendo que um dos fatores que tem contribuído para isso é a prática de melhoramento genético utilizando-se raças de outros países, sem os devidos cuidados necessários para evitar a introdução de agentes infecciosos (MARTINEZ et al., 2010; PINHEIRO et al., 2005; SOUZA et al., 2012). Trabalhando os dados destes levantamentos verifica-se que a CAE apresenta uma prevalência geral no Brasil de 10,7% (1897/17784), enquanto a Maedi-Visna de 4,6% (269/5786). Se for analisado por levantamento, todos (18/18) da CAE apresentam pelo menos um animal positivo, enquanto que da Maedi-Visna verifica-se positividade em 69% das enquetes. Estes dados demonstram que a CAE encontra-se bem mais disseminada no Brasil que a Maedi-Visna e possivelmente boa parte deste resultados sejam de ovinos infectados pela CAE em decorrência de serem criando juntos com caprinos submetidos ao mesmo manejo. Outro ponto a ser observado é que todos os levantamentos de LVPR no país foram realizados pelo teste imunodifusão em gel de agarose (IDGA), que apresenta uma sensibilidade mediana.

Diagnóstico

O diagnóstico dos LVPR fundamenta-se no quadro clínico (quando presente), consolidado por provas laboratoriais para detecção direta do vírus ou do seu material genético ou, ainda, através da detecção de anticorpos. Até o presente momento não existe um *gold test* para o diagnóstico da infecção pelos LVPR.

O isolamento viral, a microscopia eletrônica, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hibridização *in situ* são os principais métodos utilizados para a detecção direta do CAEV. Em decorrência das características da própria enfermidade, principalmente quanto ao seu caráter de infecção persistente, a sorologia para detecção do LVPR é uma forma funcional de diagnóstico, podendo ser realizada através de técnicas como: imunodifusão em gel de ágar, imunofluorescência indireta, imunohistoquímica, *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *Dot-Blot* e *Western Blot*.

Diagnóstico Clínico - Patológico

O diagnóstico clínico de animais afetados por estas viroses pode ser útil na fase sintomática. Tanto na CAE quanto na MV ocorrem quatro formas clínicas principais da doença: respiratória, nervosa, articular e mamária, que podem apresentar de forma individual ou mista. Com exceção da forma nervosa, os sinais clínicos são mais frequentes em animais acima de dois anos de idade. É interessante salientar que os animais podem estar infectados com os LVPR e não apresentarem sintomatologia clínica e/ou o aparecimento de sintomas coincidirem com situações de estresse, infecções bacterianas secundárias ou alteração na alimentação. Avaliando rebanhos infectados para a CAE, por longo tempo (mais de 15 anos), os técnicos da Embrapa Caprinos e Ovinos verificaram que os animais soropositivos geralmente apresentam algum sintoma da patologia ao longo da sua vida.

Na forma respiratória, a mais comum nos ovinos infectados com o MVV, os animais, geralmente com mais de três anos, podem apresentar dificuldade respiratória, taquipneia com presença de respiração abdominal, intolerância ao exercício, emagrecimento crônico e pneumonia intersticial crônica. Na forma neurológica (meningoencefalomielite) os animais podem apresentar incoordenação, andar em círculo, postura anormal da cabeça, nistagmo, paresia gradual posterior, que progride à paralisia e até a morte. Nos caprinos esta forma ocorre mais com animais jovens com menos de seis meses. O quadro articular, mais comum em caprinos infectados pelo CAEV e em animais com idade

superior a oito meses, é caracterizado por claudicação e aumento de volume das articulações, principalmente do carpo e tarso. Entretanto, outras articulações podem estar envolvidas. A mastite caracteriza-se por uma mastite intersticial que causa endurecimento difuso do úbere e presença de pequenos nódulos, só identificados pela cuidadosa palpação; diminuição da produção de leite e até agalactia. Outro sintoma verificado é um emagrecimento progressivo dos animais afetados apesar de manter uma boa ingestão de alimentos (CALLADO et al., 2001; DALTABUITTEST, 2006; MELO; FRANKE, 1997).

Considerando-se que o sinal clínico mais frequente na CAE, com ocorrência de 8% a 38% dos casos, é o aumento do diâmetro das articulações carpo-metacarpianas, o Índice Articular Clínico (IAC) pode representar uma ferramenta auxiliar para diagnosticar problemas articulares (GARCIA, 1993; PINHEIRO et al., 2005). Seu cálculo é baseado na diferença entre a maior medida dos diâmetros das articulações carpo-metacarpianas e a menor medida do diâmetro do metacarpo (Figuras 1 e 2). A partir de mensurações articulares de animais no Nordeste do Brasil foi montada uma tabela de IAC (Tabela 1). Este índice não é adequado para um diagnóstico para qualquer problema articular específico, entretanto, pode ser utilizado como triagem de



Foto: Raymundo Rivaldo Pinheiro

Figura 1. Medida do carpo.



Figura 2. Medida do metacarpo.

Tabela 1. Valores do IAC de caprinos segundo o tipo racial, faixa etária e sexo considerados normais, suspeitos e portadores de problemas articulares.

1	2	3	4	5	6	IAC		
						7	8	9
Puro	0,5 - 1,0	Fêmea	100	5,0	0,57	5,6	5,7 a 6,1	6,1
Leiteiro	1,0 - 2,0	Fêmea	164	5,4	0,53	5,9	6,0 a 6,5	6,5
	2,0 - 3,0	Fêmea	97	5,4	0,53	5,9	6,0 a 6,5	6,5
	acima de 3,0	Fêmea	164	5,6	0,55	6,2	6,3 a 6,7	6,7
	0,5 - 1,0	Fêmea	333	4,8	0,51	5,3	5,4 a 5,8	5,8
Mestiço	1,0 - 2,0	Fêmea	442	5,1	0,51	5,6	5,7 a 6,1	6,1
	2,0 - 3,0	Fêmea	440	5,2	0,52	5,7	5,8 a 6,2	6,2
	acima de 3,0	Fêmea	728	5,3	0,50	5,8	5,9 a 6,3	6,3
	0,5 - 1,0	Fêmea	136	4,7	0,55	5,3	5,4 a 5,8	5,8
SRD/Nativo	1,0 - 2,0	Fêmea	240	5,0	0,46	5,5	5,6 a 5,9	5,9
	2,0 - 3,0	Fêmea	144	5,1	0,51	5,6	5,7 a 6,2	6,2
	acima de 3,0	Fêmea	230	5,2	0,47	5,7	5,8 a 6,3	6,3
	0,5 - 1,1	Macho	46	5,4	0,50	5,9	6,0 a 6,4	6,4
Leiteiro	1,0 - 2,0	Macho	22	5,6	0,56	6,1	6,2 a 6,6	6,6
	2,1 - 3,1	Macho	22	5,6	0,63	6,2	6,3 a 6,9	6,9
	acima de 3,1	Macho	24	6,2	0,38	6,6	6,7 a 7,1	7,1

Continua...

Continuação.

1	2	3	4	5	6	IAC		
						7	8	9
Mestiço	0,5 - 1,1	Macho	176	5,1	0,56	5,7	5,8 a 6,2	6,2
	1,0 - 2,1	Macho	57	5,6	0,51	6,1	6,2 a 6,6	6,6
	2,0 - 3,1	Macho	25	5,6	0,63	6,2	6,3 a 6,9	6,9
	acima de 3,1	Macho	29	5,7	0,54	6,2	6,3 a 6,8	6,8
SRD/Nativo	0,5 - 1,1	Macho	74	5,1	0,55	5,7	5,8 a 6,2	6,2
	1,0 - 2,1	Macho	45	5,4	0,56	6,0	6,1 a 6,5	6,5
	2,0 - 3,1	Macho	8	5,7	0,59	6,3	6,4 a 6,9	6,9
	acima de 3,1	Macho	8	6,1	0,39	6,5	6,6 a 7,0	7,0

1 = Tipo Racial; 2 = Idade (ano); 3 = Sexo; 4 = N; 5 = Média; 6 = Desvio Padrão; 7 = Normal até (cm); 8 = Suspeito entre (cm); 9 = Provável Problema articular acima (cm).

problemas articulares (artrites e artroses). Ressalta-se que a artrite também pode ocorrer em razão de infecções bacterianas e lesões traumáticas. O diagnóstico de LVPR só é confirmado com testes laboratoriais (PINHEIRO et al., 2001).

Métodos Laboratoriais

Isolamento Viral

O isolamento viral em cultivo de células tem sido um dos métodos laboratoriais de diagnóstico mais utilizado em virologia, sendo considerado um teste padrão. Se baseia em cultivar células provenientes de tecidos ou fluidos para a posterior infecção. Estas células estão adaptadas a um meio artificial, se mantêm a 37°C, geralmente num ambiente de 5% de CO₂, com meio de cultivo, soro fetal bovino ou ovino e antibióticos. O isolamento tem também a vantagem de discriminar entre microrganismos vivos e mortos. No entanto, a técnica, apesar de sensível, apresenta algumas restrições, pois é laboriosa, onerosa e lenta, necessitando de implantação de cultivos celulares especiais, além de não detectar os vírus que não causam efeito citopático (ECP) em cultivos celulares.

Para o isolamento dos LVPR existe uma variedade de cultivos primários ou de linhagem. As principais culturas celulares para estes vírus são membrana sinovial, plexo coroíde, membrana nictitante e explante

de pulmão (CELER, et al., 1997; PINHEIRO, et al., 2006; SIGURDARDOTTIR; THORMAR, 1964; SOUSA, et al., 2012).

A infecção dos LVPR nas células pode variar de semanas a meses, dependendo da adaptação do vírus às condições de laboratório, dose infectante, diversidade e virulência da cepa. O aparecimento dos efeitos citopáticos (ECP) necessita de pelo menos duas a três passagens de células, com sete dias de intervalo, em virtude de sua replicação lenta. Uma grande variação é verificada quanto ao tipo e ao tempo de aparecimento do ECP produzido pelos isolados, além disso, os isolados virais de LVPR podem não causar efeitos citopáticos evidentes. O ECP mais característico é a presença de células multinucleadas típicas (sincício) apresentando de cinco a 30 núcleos. Estas células ao morrerem se desprendem da monocamada formando estruturas como balões flutuando no meio de cultivo (Figura 3). Este efeito geralmente é observado por volta dos 14 dias pós-infecção, entretanto pode variar de seis a 21 dias (CELER et al., 1997; LAMARA et al., 2001). Daltabuit Test et al. (1999) reporta ECP de LVPR somente com seis meses. Outros efeitos como destruição da monocamada, vacuolização de células também podem ser observados como efeito

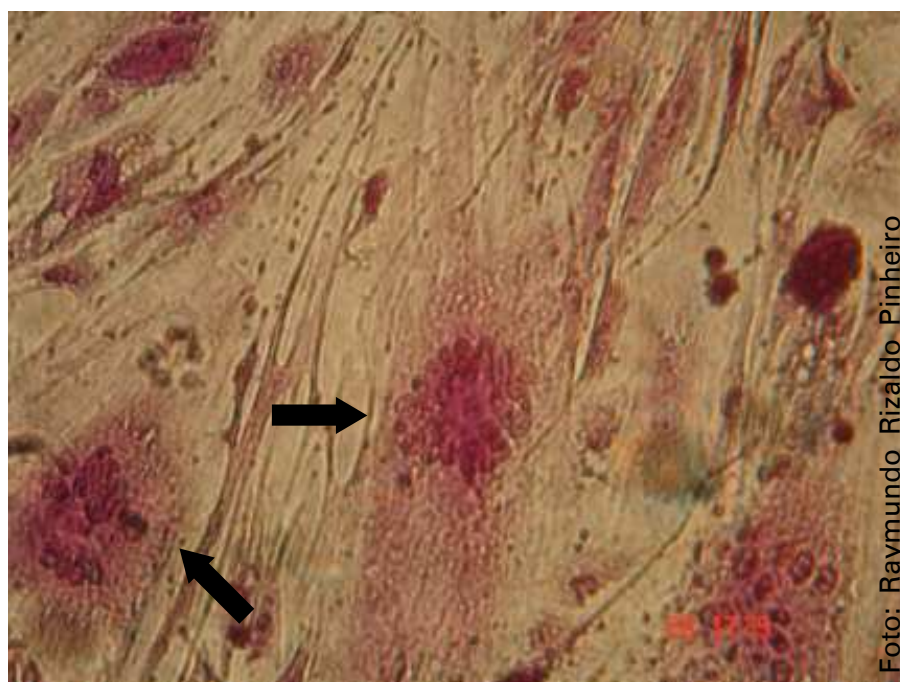


Foto: Raymundo Rizado Pinheiro

Figura 3. Sincício (setas) em cultura primária de MSC inoculada com fluido uterino de cabras infectadas naturalmente com o CAEV. Coloração cristal violeta 0,1%, aumento 320X.

destes vírus. Singh et al. (1999) confirmaram a presença do vírus e produção viral sem a presença de sincícios.

Os LVPR podem ser isolados de amostras de animais vivos, tanto pelo co-cultivo em membrana sinovial (MSC) de células, como leucócitos do sangue periférico, células somáticas do leite, sêmen e fluidos uterinos, e, também, de animais infectados, a partir de *explants* de tecidos como MSC, glândula mamária, pulmão, plexo coroide e tecidos linfoides. O cultivo de macrófagos seguido de co-cultivo de MSC é outra forma de isolamento.

No caso de detecção viral em amostras de sêmen, pode haver substâncias antivirais ou tóxicas para as células MSC presentes no plasma seminal. O sêmen pode, também, apresentar forte carga de contaminação bacteriana, sendo necessários o tratamento prévio com antibióticos e a diluição, com o intuito de diminuir os efeitos tóxicos das substâncias presentes no plasma seminal. Todavia, a diluição do sêmen pode diminuir a carga viral a valores abaixo do detectável em cultura, levando a resultados falso-negativos.

Microscopia Eletrônica (ME)

Existem basicamente dois tipos de microscópios eletrônicos, o microscópio de transmissão de elétrons e o microscópio de elétrons por scanner (varredura). Para o estudo de estrutura viral, a técnica escolhida é a de transmissão. Podem ser obtidas duas informações: a presença de estrutura viral e o número de partículas virais. As partículas virais do CAEV medem de 70 a 110 nm, possuem um corpo central de 30 a 50 nm e apresentam forma e tamanho semelhantes aos do MVV. Nas células infectadas com LVPR observam, por ME, vários brotamentos virais com 120 a 140 nm de diâmetro, além de virions livres no espaço extracelular, medindo de 80 a 110 nm de diâmetro, e virions e fragmentos virais no citoplasma de células infectadas. Os brotamentos virais na sua superfície ocorrem geralmente dentro de pequenos vacúolos citoplasmáticos, sendo estes brotamentos similares àqueles de retrovírus do tipo C. Este método é interessante para estudo de ultraestrutura dos vírus. Entretanto é uma técnica muito cara e trabalhosa para sua utilização em rotina de

diagnóstico. Recentemente, a microscopia imunoeletrônica é um método que está se implantando por ser rápido para o diagnóstico de amostras de tecido infectado.

O primeiro relato de ME em LVPR foi em cultivos de plexo coroide infectados com MVV. Recentemente, Ricarte et al. (2010) detectaram através de ME partículas virais na porção intermediária de espermatozoides (Figura 4).

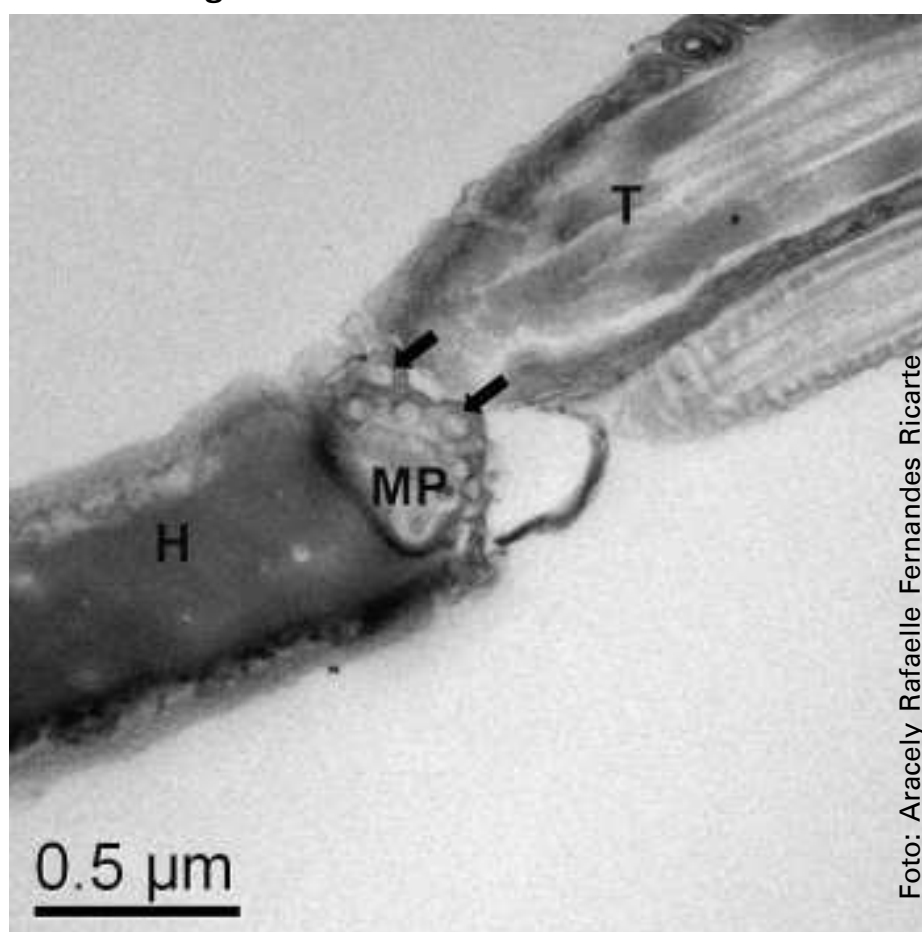


Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão – inclusões do CAEV na parte intermediária do espermatozoide caprino.

Hibridização *in situ* (HIS)

Esta técnica consiste na identificação de segmentos específicos de ácido nucleico de origem viral, RNA no caso dos LVPR, encontrados em tecidos ou células infectados, previamente fixados, capazes de serem detectados por sondas de DNA marcadas por enzimas ou por radioatividade (DNA 35S). As sondas são sequências de nucleotídeos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do

DNA ou RNA que se deseja identificar. Esta técnica é de uso limitado, em decorrência da alta mutabilidade dos LVPR, além de ser laboriosa e cara para ser colocada em rotina. Entretanto, pode ser utilizada para dirimir dúvidas de resultados duvidosos.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação *in vitro* dos ácidos nucleicos permite a obtenção de milhares de cópias de uma sequência específica de DNA. Desta forma, a PCR vem sendo adotada em todo o mundo na pesquisa de microrganismos devido à especificidade, sensibilidade e rapidez de seus resultados. É possível detectar o DNA proviral do CAEV um dia após a infecção dos cultivos celulares e de apenas uma célula infectada em um cultivo de 10^6 células, sendo que a PCR é a técnica mais eficiente em detectar DNA no sangue nos estágios iniciais da doença.

Os primeiros trabalhos sobre o uso da PCR no diagnóstico veterinário apareceram no final dos anos 80 e tem sido de grande importância para o diagnóstico de doenças virais, em várias amostras de animais, visto que os métodos de diagnóstico tradicionais requerem longos e complexos procedimentos, como cultivo de células e microscopia eletrônica. Outra vantagem da PCR é que esta técnica pode detectar pequenas quantidades de DNA e RNA viral presentes no material, amplificando-o em quantidades identificáveis. Até mesmo patógenos de difícil crescimento em cultivo ou que se encontrem sob estado de latência ou integrados ao genoma do hospedeiro, ou, ainda, microrganismos mortos, podem ser detectados pelo método.

A PCR tem sido utilizada para a pesquisa do DNA–proviral do lentivírus de caprinos em diferentes amostras como: sangue, líquido sinovial, leite e soro do leite, tecidos, sêmen, fluidos uterinos e embrião (ANDRIOLI, 2001; ANDRIOLI et al., 2002a, 2002b) (Figura 5).

O grande êxito da PCR depende em grande parte da eleição do gene viral e do desenho correto dos *primers* que devem ser específicos do vírus.

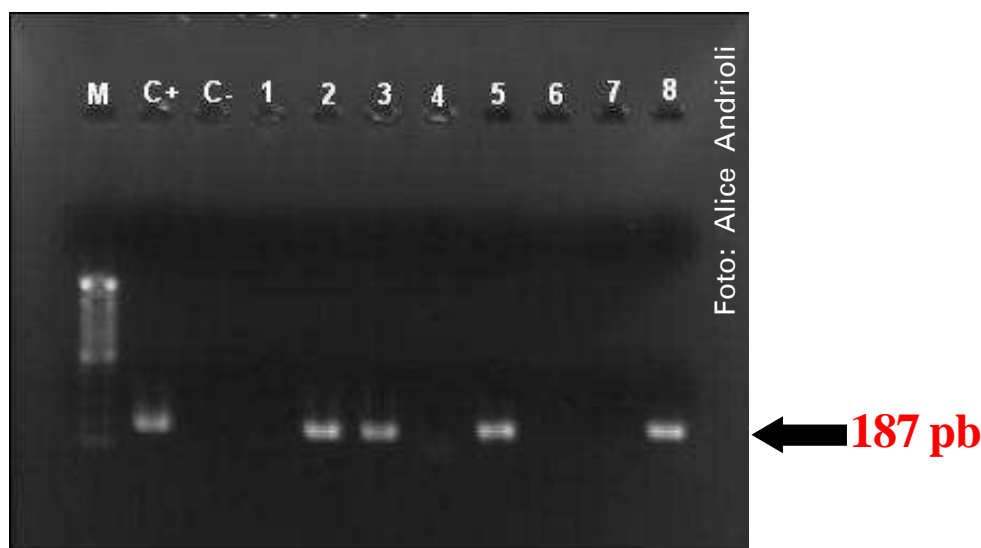


Figura 5. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Reação em cadeia de polimerase – RT-PCR *nested* de amostras de ovócitos de cabras infectadas com o CAEV, bandas de 187 pb. Sendo M – marcador DNA; C+ controle positivo; C - controle negativo; 2, 3, 5 e 8 – amostras positivas; 1, 4, 6 e 7 amostras negativas.

No caso dos LVPR, esta técnica permite a detecção da infecção em animais com anticorpos colostrais e é particularmente importante para a identificação de animais que apresentam soroconversão tardia ou resultado sorológico duvidoso. Porém, parece não haver relação entre o título de anticorpos e o aparecimento de bandas positivas à PCR no sangue e nem todas as amostras positivas aos testes sorológicos são também positivas na PCR.

Cerca de 3000 monócitos, contendo de 30 a 240 células infectadas, são suficientes para gerar resultados positivos na PCR, porém há uma quantitativa diferença no nível de células associadas ao vírus entre animais, os quais podem variar de 10^3 a 10^5 monócitos para a detecção. Desta forma, parece que a taxa de infecção dos monócitos varia entre indivíduos portadores de LVPR, provavelmente, devido ao nível de restrição da expressão viral, portanto, a sensibilidade depende do tamanho da amostra. Recomenda-se a coleta de 10 mL de sangue para esta prova.

Quanto à detecção dos lentivírus no sêmen, tem sido descrita a presença de fatores inibidores da síntese de ácidos nucleicos presentes no plasma seminal. Esses fatores interferem no uso do DNA como

template, pois parece que esses oligopeptídeos se ligam ao DNA. Desta forma, são utilizadas algumas técnicas para separar o plasma seminal das células (ANDRIOLI, et al., 1999; ANDRIOLI, et al., 2006).

A PCR *Nested* ou PCR duplo *Nested* aumenta a sensibilidade quando comparada à PCR simples, enquanto que a combinação do uso de PCR múltiplos reduz o número de falsos negativos. Porém, estas técnicas são mais caras e trabalhosas, além de apresentarem, no caso da PCR *Nested* grande risco de contaminação do laboratório com DNA amplificado levando a ocorrência de falsos positivos.

A dificuldade em amplificar o DNA proviral dos lentivírus pode estar na sua característica em apresentar uma alta taxa de mutação. As diferenças de sensibilidade da PCR se devem a variabilidade genética entre as cepas de LVPR. A região *gag* do genoma dos lentivírus é a mais conservada, quando comparada às regiões *pol* e *tat*. A variação das sequências de bases no genoma dos lentivírus afeta a eficiência da PCR, pois esta é intimamente dependente da complementaridade entre os *primers* e *template*. Os vírus RNA de forma geral e particularmente os lentivírus apresentam grande variedade de *quasispécies*, o que se atribui ao fato da RNA polimerase ter, intrinsecamente, altas taxas de erro, desta forma, os lentivírus se reproduzem imperfeitamente. Este mecanismo é útil aos vírus na sua habilidade de escape das defesas do hospedeiro e de produzir infecção persistente. Desta forma, a escolha dos *primers* é de suma importância para o sucesso da técnica de PCR. Em virtude do genoma destes vírus apresentarem duas regiões LRT (*Long Terminal Repeat*), *primers* desenhados destas áreas têm apresentado bons resultados, principalmente por duplicar a chance de amplificação.

Quando o objetivo é detectar o vírus livre é necessário realizar o RT-PCR, purificando inicialmente o RNA viral e transcrevendo o RNA em DNA complementar (DNAC) utilizando a enzima transcriptase reversa. Esta técnica já foi padronizada para várias amostras clínicas e é muito útil para o estudo da patogenia da enfermidade (SIDER et al., 2010a, 2010b, 2010c).

Esta técnica poderá ser utilizada em programas de erradicação para identificar os animais não diagnosticados por sorologia. Devido ao custo e aos resultados discordantes entre testes sorológicos e PCR, sugere-se que esta técnica seja empregada para esclarecer resultados sorológicos indeterminados ou negativos.

Outra variação da técnica do PCR é a PCR quantitativa (PCRq). Esta técnica permite a detecção e quantificação de ácidos nucleicos. A diferença com a PCR convencional é que a PCRq se baseia na detecção de fluorescência, a qual aumenta proporcionalmente ao tempo em que o produto de PCR é amplificado. A estratégia de marcação se baseia em sondas marcadas com fluoróforos (*Taqman*) ou sem a utilização de sondas, através de composto fluorescente para detecção de DNA (*SYBR green*). A detecção da fluorescência se realiza mediante filtros de emissão otimizados para o uso de fluoróforos e, no caso de sondas marcadas com diferentes compostos fluorescentes, permite o desenvolvimento de reações multiplex. A base teórica do PCR em tempo real está na determinação do ciclo de amplificação (limiar) em que a fluorescência emitida ultrapassa um determinado nível acima do ruído de fundo ou de um valor baseado em um fluoróforo referência. O valor do ciclo limiar é, em geral, diretamente correlacionado com a quantidade inicial de sequência alvo na amostra. A quantificação do DNA e o RNA pode ser relativa ou absoluta. A relativa determina a quantidade de moléculas relativizadas frente a um ou vários genes endógenos, ideal para análise de expressão gênica. A absoluta permite obter o número exato de moléculas comparado a uma curva padrão, ideal para detecção de partículas virais sendo possível a quantificação de menos de cinco cópias de DNA ou RNA com um desvio padrão de menos de 2%.

Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)

Devido à praticidade na coleta das amostras e ao baixo custo/benefício, a detecção de anticorpos contra LVPR é amplamente utilizada, sendo a IDGA recomendada para o diagnóstico inicial de triagem num rebanho ou região onde seja desconhecida a prevalência da CAE. Este teste é recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o diagnóstico de infecção por LVPR, no caso de comércio internacional

de pequenos ruminantes (OIE, 1996). O teste de imunodifusão dupla de Ouchterlony fundamenta-se na difusão de anticorpo e antígeno solúvel em uma base semi-sólida contendo ágar e eletrólitos. Quando antígeno e anticorpo se encontram em concentrações equivalentes, interatuam e precipitam, formando imunocomplexos estáveis que podem ser visualizados como linhas de precipitação.

O teste de microimunodifusão (MIDGA) para o diagnóstico dos lentivírus reduz o custo por diminuir comparativamente a quantidade de antígeno necessário no teste. O MIDGA mais utilizado é o hexagonal por apresentar melhores resultados, dado que a amostra de soro a ser testada fica posicionada entre dois padrões positivos, facilitando a leitura do resultado (GOUVEIA, 1994).

O teste de IDGA utiliza antígeno produzido em cultivo celular geralmente de membrana sinovial com cepas padrões do CAEV e do MVV. Os anticorpos detectados vão dirigidos a glicoproteína de superfície gp135, a proteína do capsídeo p25 no caso do MVV ou p28 do CAEV. Estas proteínas (Figuras 6 e 7) são as responsáveis pelas linhas de precipitação observadas no teste de IDGA, sendo que o antígeno gp135 detecta maior número de caprinos infectados do que o antígeno p28, ainda que alguns animais desenvolvam resposta anti-p28 na ausência de resposta anti-gp135. Salienta-se, portanto, a importância da escolha dos soros de referência utilizados em testes IDGA para diagnóstico de infecção por LVPR (PINHEIRO et al., 2010). A sensibilidade do antígeno produzido a partir do vírus da CAE é, aproximadamente, 35% maior do que a obtida no teste que emprega o antígeno heterólogo (MVV).

Segundo Varea et al. (2001), a sensibilidade e especificidade do IDGA-LVPR frente ao *Western Blot* foram de 76,3% e 98,3%, respectivamente. Dados similares, foram observados por Rodrigues et al. (2009). Entretanto, Azevedo et al. (2011) verificaram uma baixa sensibilidade (21,6%) do IDGA frente ao *Western Blot*. A exigência da participação de múltiplas interações epítomos-anticorpos para um resultado positivo é uma das principais causas que leva a baixa sensibilidade do IDGA.

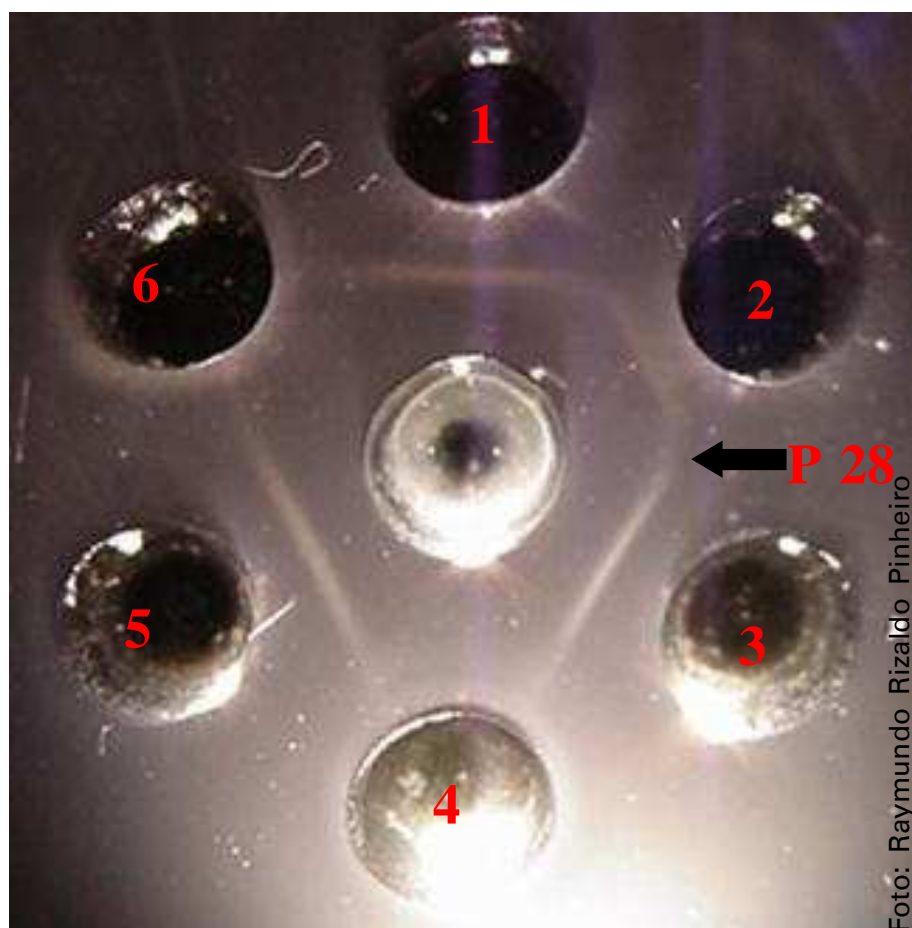


Foto: Raymundo Rizaldo Pinheiro

Figura 6. MIDGA realizado com antígeno de CAEV com a proteína p28. Os poços 1, 3 e 5 possuíam soro reagente. O poço 2 soro positivo, o poço 4 soro negativo e o poço 6 soro fraco positivo.

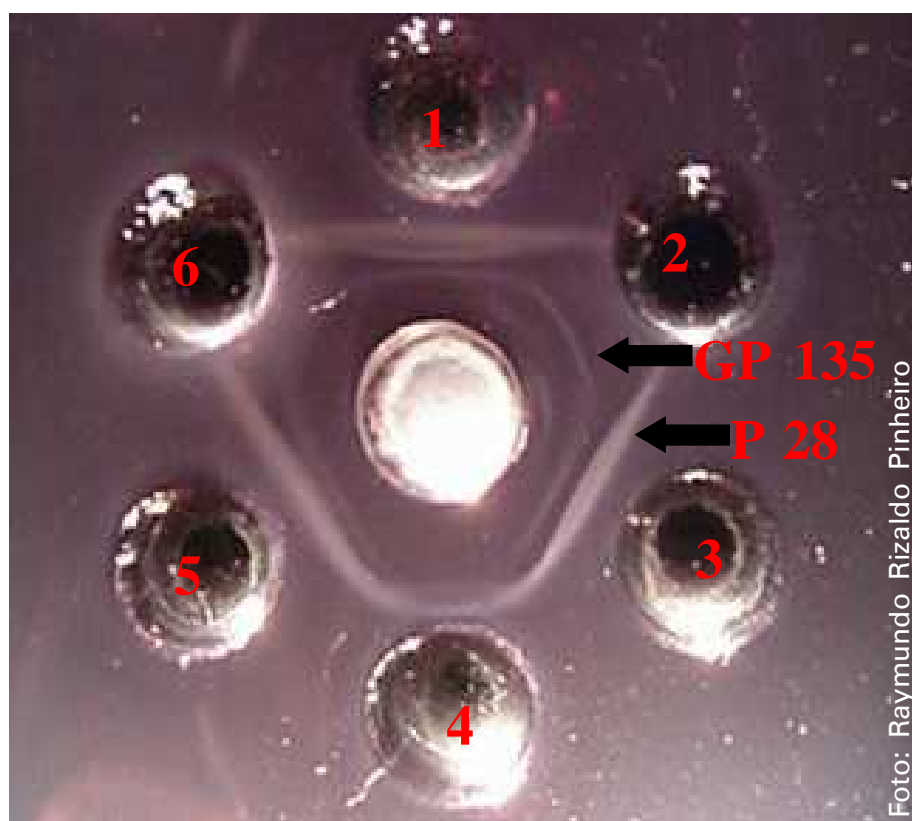


Foto: Raymundo Rizaldo Pinheiro

Figura 7. MIDGA realizado com antígeno de CAEV com as proteínas p28 e gp 135. Os poços 1, 3 e 5 possuíam soro reagente para as duas proteínas. Os poços 2 e 6 soro negativo para p28 e positivo para gp 135. O poço 4 soro positivo para as duas proteínas.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

As reações de imunofluorescência indireta possibilitam a visualização da interação antígeno/anticorpo, através de uma anti-imunoglobulina com fluorocromos. Estas substâncias são capazes de absorverem energia luminosa tornando-se excitadas por um curto espaço de tempo. Tais substâncias passam a liberar tal energia na forma de fluorescência (Figura 8). Os fluorocromos mais comuns são os do grupo da rodamina (fluorescência vermelha) e o isotiocianato de fluoresceína (fluorescência verde).

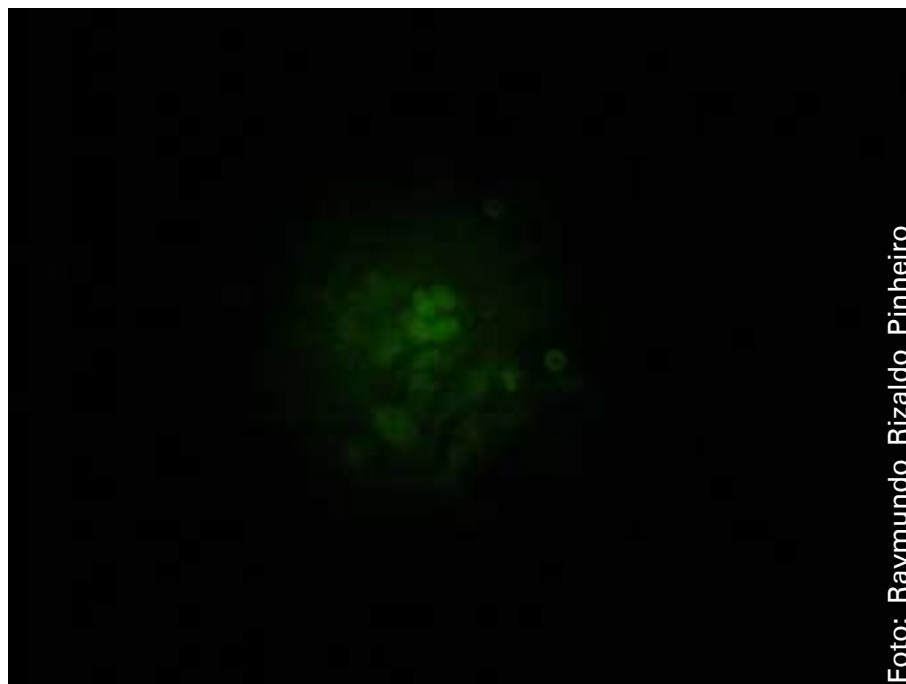


Figura 8. Imunofluorescência indireta de soro positivo para LVPR (400x).

Esta técnica pode ser usada para detectar e titular anticorpos, como também, identificar e localizar antígenos. São poucos os trabalhos, na literatura, empregando RIFI no diagnóstico dos LVPR. Comparando os testes RIFI, IDGA e ELISA, na pesquisa de anticorpos contra o MVV, verificou-se que o a RIFI e a IDGA apresentaram concordância de 94%. Utilizada como referência em outras retrovirose, tais como a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a RIFI chega a 100% de concordância entre o ELISA e *Western Blot*.

Apesar de a técnica apresentar uma boa sensibilidade e ser relativamente barata, é necessário um treinamento específico, principalmente com relação à leitura dos resultados.

Imunohistoquímica (IHQ)

A imunohistoquímica se fundamenta na detecção de um antígeno mediante anticorpos policlonais ou monoclonais específicos e um sistema de revelação, geralmente diaminobenzidina (DAB). Os complexos antígeno-anticorpo são observados em microscopia óptica. Com o objetivo de melhorar a visualização da reação geralmente empregam-se sistemas de amplificação de sinais como método peroxidase – antiperoxidase ou biotina-streptavidina. Com esta técnica foi observada a presença de LVPR em várias células e tecidos: nervoso, pulmonar, sistema monocítico-fagocitário, glândula mamária, células da granulosa derivados de oviduto, células intersticiais e epiteliais do epidídimo. Os testes imunohistoquímicos são principalmente utilizados para estudo da patogenia e como diagnóstico diferencial dos LVPR.

Ensaio Imunoenzimáticos

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O ensaio imunoenzimático (ELISA) se baseia na utilização de antígenos ou anticorpos marcados com enzima, de forma que os conjugados resultantes tenham atividade tanto imunológica como enzimática. Estando um dos componentes (antígeno ou anticorpo) marcado com uma enzima e insolubilizado sobre um suporte, a reação antígeno-anticorpo ficará imobilizada e poderá, facilmente, ser revelada mediante a adição de um substrato específico que, sob ação da enzima, produzirá uma cor vista a olho nu, podendo ser quantificado mediante o uso de um espectrofotômetro (Figura 9).

As provas de ELISA se dividem em cinco categorias: 1 – Indireto (ELISAI) que consiste na fixação do antígeno numa placa, a qual se unem os anticorpos presentes na amostra. A qualidade da purificação do antígeno pode ser um fator limitante da prova, quanto maior seja a pureza mais alta será a sensibilidade e especificidade; 2 – direto (ELISA) detecta antígeno ou anticorpo; 3 – ELISA *sandwich* direto - detecta antígeno; 4 - ELISA de competição, onde compete dois anticorpos para a união antígeno-anticorpo; e 5 – ELISA de bloqueio onde compete dois anticorpos para a junção antígeno-anticorpo, entretanto uma incubação prévia bloqueia a união entre um dos dois anticorpos.

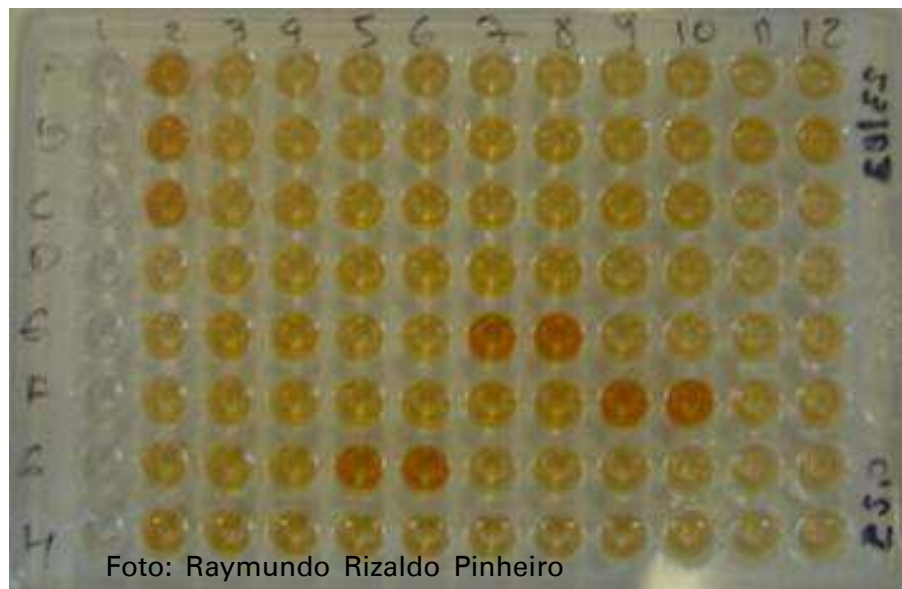
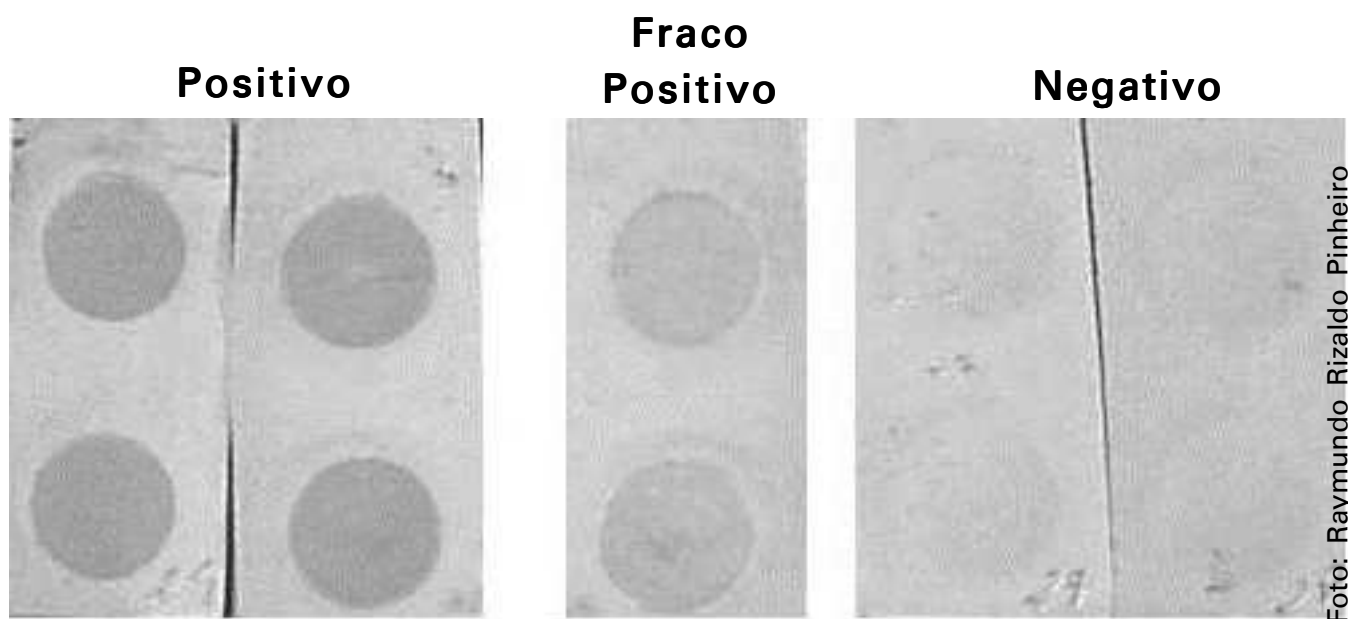


Figura 9. Placa de ELISA com resultados positivos e negativos para LVPR.

Diversos testes de ELISA foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos para LVPR, onde são empregados tanto antígenos nativos como recombinantes. Este é outro teste recomendado pela OIE para o diagnóstico dos LVPR. De acordo com o antígeno (tipo, número e purificação das proteínas virais) e a técnica do ELISA empregados (indireto, sanduíche, etc) existe uma grande variação de sensibilidade e especificidade. A diversidade viral dos LVPR também influencia diretamente na sensibilidade do teste. Apesar disto, esta técnica, de uma maneira geral, apresenta boa sensibilidade e mantém alta a especificidade, sendo, portanto, indicada na utilização de programa de controle desta enfermidade. É aconselhável a utilização de antígeno com duas ou mais proteínas, de preferência a *core* proteína p28, a transmembrânica gp40 e a de superfície gp135, ou com o vírus total.

Dot-Blot (Dot-ELISA ou Dot-imunoblotting)

O *Dot-imunoblotting* pode ser usado como método qualitativo para separar rapidamente um grande número de amostras, ou como uma técnica quantitativa para determinação da concentração de antígeno (Figura 10). As amostras são aplicadas em uma tira de nitrocelulose coberta com anticorpos e analisadas por um dos sistemas de detecção. A técnica é usada como um método qualitativo, para avaliar os vários parâmetros que afetam a qualidade do *Western Blot* após a transferência do antígeno para a membrana.



Quantidade do antígeno - 0,5 /poço

Diluição do conjugado - 1:500

Diluição do Soro - 1:50

Figura 10. Dot-Blot para o diagnóstico sorológico de LVC de um *pool* de soros positivos, fracos positivos e negativos, testados pelo IDGA.

A sensibilidade deste teste é maior que o IDGA e similar ao ELISA cujo antígeno é o vírus total (PINHEIRO, 2001). No diagnóstico da CAE, o Dot Blot é um teste com boa resolução e baixa reação inespecífica sendo mais viável que a IDGA e o ELISA indireto para utilização no controle desta enfermidade, pois além de ser mais sensível que a IDGA, não necessita da indumentária tecnológica do ELISA. É, também, mais barato, mais rápido e, conseqüentemente, mais prático, podendo ser utilizado em eventos (exposições, leilões, etc) ou, até mesmo, no campo (ARAGÃO et al., 2008; PINHEIRO et al., 2006).

Immunoblotting ou Western blotting (WB)

O WB em princípio, pode ser delineado como método onde proteínas (anticorpos séricos ou plasmáticos) podem ser imobilizadas em uma membrana ou transferidas por capilaridade, difusão ou forças elétricas. As forças de ligação da membrana podem ser de natureza covalente ou não-covalente (BJERRUM; HEEGAARD, 1988). O material proteico deve ser separado antes da transferência por eletroforese. O complexo

antígeno-anticorpo é visualizado através da aplicação de um conjugado enzimático ao qual se adiciona um substrato que reage com a enzima, dando cor à reação. Em decorrência de ser uma técnica demorada e laboriosa vem sendo utilizada em LVPR somente para esclarecer resultados divergentes e no estudo da composição das proteínas virais dos LVC. Entretanto, a Embrapa Caprinos e Ovinos padronizou uma rotina da técnica de WB agilizando as etapas de sua realização (PINHEIRO et al., 2011).

O WB detecta anticorpos para p28 já aos quatro dias pós-infecção, enquanto no ELISA indireto os anticorpos são detectados 15 a 20 dias pós-infecção. Comprova-se, assim, a alta sensibilidade do Western Blot para detecção precoce de anticorpos para o CAEV. É um teste muito sensível e específico, mas não pode ser considerado um *gold test* (Figura 10). Cavalcante (2011) estudando 13 matrizes inoculadas pela cepa viral CAEV *Cork* e todas soropositivas no IDGA e WB com 30 e 60 dias pós-infecção, verificou que após 24 meses os animais soronegativaram no IDGA e somente três tiveram resultado positivo no WB. Observou, também, que dessas treze cabras, três tiveram resultado negativo no IDGA, Elisa-i, WB e PCR-Nested de sangue, porém foram positivas no PCR-Nested e/ou RT-PCR de ovócito e/ou fluído uterino, demonstrando reações soropositivas intermitentes (CLAVIJO; THORSEN, 1996; HANSON et al., 1996), e que o vírus em alguns momentos pode ser detectado em órgãos e/ou tecidos e não na corrente sanguínea.

As bandas de proteínas do sobrenadante viral presentes no gel SDS-PAGE a 12,5% são muitas, em decorrência da sua composição: meio de cultura, soro fetal bovino e proteínas virais. Porém, após a transferência e a reação imunoenzimática somente algumas proteínas são evidenciadas, dentre elas as proteínas de 19 KDa, 28 KDa, 43 KDa e 67KDa. A banda proteica mais visível foi da proteína do capsídeo viral cujo peso molecular é de 28 KDa (seta) e representa o maior componente estrutural do núcleo, sendo a proteína de base para a interpretação do WB (Figura 11).



Foto: Apoliana de Sousa Rodrigues

Figura 11. Teste de *Western Blotting* para o diagnóstico da Artrite Encefalite Caprina. Detecção da proteína viral p28 (setas).

Comparação de Testes Sorológicos no Diagnóstico da CAE

Com a finalidade de avaliar o nível de detecção de anticorpos anti-CAEV dos três principais testes sorológicos (IDGA, ELISA e WB) foram realizadas diluições seriadas de um pool de soros de animais positivos. Os resultados estão detalhados na tabela 2.

A classificação do nível de positividade dos testes foi verificada de acordo com a espessura das bandas nas fitas do WB, espessura da linha de precipitação Ag/Ac do IDGA e pela absorbância do ELISA. Nos testes WB e IDGA foram estabelecidos níveis de 1 a 6 relacionados ao grau de positividade (Tabela 2). Nas colunas relacionadas ao teste de IDGA, observa-se que somente até a diluição 1/8 visualizou-se linha de precipitação. No ELISA, resultados positivos foram alcançados até a diluição 1/64. Enquanto no WB, verificou-se que até a diluição 1/1024 apresentou positividade. Com isso, constatou-se que o WB tem a capacidade de detectar anticorpos numa diluição de até 128 vezes maior que o IDGA e 16 vezes maior que o ELISA. Quando comparou-se o ELISA com o IDGA constatou-se que o ELISA tem a capacidade de detectar diluições oito vezes maior que o IDGA.

Entretanto, convém salientar que a sensibilidade e a confiança dos testes sorológicos não dependem somente do tipo de teste utilizado, mas pode ser influenciado pelo método de preparação do antígeno utilizado no diagnóstico, na escolha da cepa viral, e dos componentes virais do antígeno mais relevantes imunologicamente (CELER JÚNIOR et al., 1998).

Tabela 2. Comparação dos três principais testes de diagnóstico sorológico da Artrite Encefalite Caprina

Diluição	IDGA		ELISA		WB	
	Nível de Pos.	Resultado	Nível de Pos.	Resultado	Nível de Pos.	Resultado
Puro	++++	POS	0,905	POS	++++	POS
1//2	+++	POS	0,830	POS	++++	POS
1//4	++	POS	0,783	POS	++++	POS
1//8	+	POS	0,766	POS	++++	POS
1//16	-	NEG	0,556	POS	++++	POS
1//32	-	NEG	0,473	POS	++++	POS
1//64	-	NEG	0,355	POS	+++	POS
1//128	-	NEG	0,212	NEG	++	POS
1//256	-	NEG	0,111	NEG	+	POS
1//512	-	NEG	0,069	NEG	*(+)	POS
1//1024	-	NEG	0,045	NEG	(+)	POS
1//2048	-	NEG	0,044	NEG	Traços	Incon.
1//4096	-	NEG	0,027	NEG	-	NEG
1//8192	-	NEG	0,021	NEG	-	NEG

* meia cruz.

Nível 1: +++++; nível 2:+++; nível 3: ++; nível 4: +, nível 5: (+) e nível 6: traços.

Pos = Positividade; Incon. = Inconclusivo

Conclusão

A detecção precoce e a remoção dos animais infectados dos rebanhos são a base do sucesso dos programas de controle. Portanto, a eficiência de programas de controle das LVPR depende da sensibilidade e da especificidade do teste diagnóstico, da frequência de sua utilização nos animais e do manejo utilizado no rebanho. A identificação dos animais infectados por LVPR é geralmente feita de forma indireta, sendo a IDGA com antígenos de origem ovina e caprina, o teste comumente empregado. Entretanto, fatores como a soroconversão tardia, latência viral, latência sorológica, replicação restrita, manejo do rebanho e limitações de alguns testes em detectar animais infectados têm implicação direta no sucesso de programas de controle destas enfermidades. Somado a isto, a grande variabilidade antigênica e genética dos LVPR induz à necessidade do desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e específicas para o diagnóstico dos LVPR, para que possa reduzir o número de resultados falsos-negativos.

Como teste inicial de triagem para detecção de animais portadores de LVPR, o teste de IDGA pode ser utilizado, entretanto deve ser feito de preferência com antígeno homólogo e que possua, preferencialmente, duas proteínas (p28 e gp 135). Além deste teste, pode ser utilizado o teste de ELISA. No caso de programas de controle mais avançados ou programas de erradicação devem ser utilizadas provas sensíveis como o WB, associadas a provas de detecção direta como a PCR.

Referências

ANDRIOLI, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões.** 2001. 68 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/59978/1/TS-Alice-andrioli.pdf>>. Acesso em: 5 dez. 2012.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. de S.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 8, p.1313-1319, ago., 2006. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/AI-SEDE/36412/1/41n08a15.pdf>. Acesso em: 12 dez., 2012.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MOURA SOBRINHO, P. A. PINHEIRO, R. R.; SALLES, H. O. Transferência de embriões em cabras naturalmente infectadas pelo lentivírus caprino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 5, p. 215-220, 2002a.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; ROCHA, M. A.; MARTINS, A. S.; SANTOS, D. O. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p.420-421, 1999. Resumos do 13º. Congresso Brasileiro de Reproducao Animal, 1999.

ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F. Avanços da biotecnologia da reprodução em caprinos o ovinos e sua correlação com os riscos de transmissão de doenças infecciosas. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 12, p. 56-62, 2002b.

ARAGÃO, M. A. C.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F. S. F.; OLIVEIRA, A. A. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Maedi-visna vírus: produção de antígeno, análise protéica e antigênica. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 4, p. 423-429, out./dez., 2008. Disponível em:

<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/53283/1/API-Maedi-visna.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2012.

AZEVEDO, D. A. A.; ALVES, S. M.; MAGALHÃES, D. C.T.; SOUSA, T. B. C.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R. Inquérito sorológico da artrite encefalite caprina através de Western Blot e Imunodifusão em Gel de Agarose em rebanhos caprinos leiteiros do estado de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 5., 2011, João Pessoa. [Anais...]. João Pessoa: [SEBRAE-PB], 2011. 3 f. 1 CD ROM. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/46608/1/AAC-Inquerito-sorologico.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2012.

BJERRUM, O. J.; HEEGAARD, N. H. H. **Handbook of immunoblotting of proteins**. Technical descriptions. Florida: CRC Press, 1988. v. 1, 265 p.

BRELLOU, G.D.; ANGELOPOULOU, K.; POUTAHIDIS, T.; VLEMMAS, I. Detection of Maedi-Visna Virus in the liver and heart of naturally infected sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, n. 1, p. 27-35, 2007.

BRITO, R. L. L. de. Implicações da Artrite-Encefalite Caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/28855/1/TS-Implicacoes-da-artrite-encefalite-caprina-na-reproducao.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2012.

CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S. de; TEIXEIRA, M. F. da S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 87-97, 2001.

CARNEIRO, F. F. D. **Perdas econômicas decorrentes da Artrite-Encefalite Caprina em rebanho leiteiro**. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/>

bitstream/item/42240/1/TS-Perdas-economicas-decorrentes.pdf>.
Acesso em: 15 dez. 2013.

CAVALCANTE, F. R. A. **Detecção do vírus da Artrite-Encefalite Caprina por PCR-Nested e RT-PCR-Nested em ovócitos e fluído uterino de cabras infectadas**. 2011. 48 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.

CELER JÚNIOR, V.; NEMCOVA, H.; CELER, V. Isolation and partial characterization of ovine lentivirus in Czech Republic. **Folia Microbiologica**, v. 42, n. 4, p. 395-399, 1997.

CLAVIJO, A.; THORSEN, J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. **Small Ruminant Research**, v. 22, n. 1, p. 69-77, Aug., 1996.

COSTA, L. S. P. da; LIMA, P. P.; CALLADO, A. K. C.; NASCIMENTO, S. A. do; CASTRO, R. S. De. Lentivírus de pequenos ruminantes em ovinos Santa Inês: isolamento, identificação pela PCR e inquérito sorológico no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.74, n.1, p.11-16, 2007. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v74_1/costa2.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2012.

DALTABUIT TEST, M. E. **Desarrollo y aplicación de técnicas de diagnóstico serológico y molecular para el estudio de la transmisión calostrál y horizontal del virus Maedi-Visna (VMV) em ovino**. Vitoria-Gasteiz: Eusko Jaurlaritzaren Argitalpen Zerbitzu Nagusia, 2006. 152p. (Tesis doctorales, 57). Tesis Doctorales presentado Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 2005. Disponível em: <http://www.euskadi.net/contenidos/informe_estudio/tesis_doctorales/es_agripes/adjuntos/tesis_doctoral57.pdf>. Acesso em: 5 dez. 2012.

DALTABUITTEST, M.; CONCHA-BERMEJILLO, A. de la; ESPINOSA, L.E.; LOZA RUBIO, E.; AGUILAR SETIÉN, A. Isolation of caprine arthritis

encephalitis virus from goats in Mexico. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 3, p. 212-215, Jul., 1999.

GARCIA, M. Artrite encefalite caprina: uma nova doença no Brasil. **A Hora Veterinária**, São Paulo, v.13, n. 76, p. 57-59, 1993.

GJERSET, B.; JONASSEN, C. M.; RIMSTAD, E. Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. **Virus Research**, v. 125, n. 2, p. 153-161, May, 2007.

GOUVEIA, A. M. **Padronização de microtécnica de imunodifusão em gel de agarose para diagnóstico de lentivírus Pneumonia Progressiva Ovina (OPP) - Maedi-Visna (MVV) - Artrite Encefalite Caprina (CAEV)**. Sobral, 1994. 4 f. (mimeografado).

GREENWOOD, P. L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in NewSouth Wales, Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 22, v. 1-2, p. 71-87, 1995.

HANSON, J.; HYDBRING, E.; OLSSON, K. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 37, n. 1, p. 31-39, 1996.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIERA, D.; CHEBLOUNEB, Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. **Virus Research**, v. 79, n. 1/2, p.165-172, Nov., 2001.

LEROUX, C.; CRUZ, J.C.M.; MORNEX, J.-F. SRLVs: A genetic continuum of lentiviral species in sheep and goats with cumulative evidence of cross species transmission. **Current HIV Research**, v. 8, n. 1, p. 94-100, Jan., 2010.

LILENBAUM, W.; SOUZA, G. N.; RISTOW, P.; CORTEZ MOREIRA, M.; FRÁQUASA, S.; CARDOSO, V. da S. Serological study on Brucella

abortus, caprine arthritis–encephalitis virus and Leptospira in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 173, n. 2, p.408-412, Mar., 2007.

MARTINEZ, P. M.; COSTA, J. N.; SOUZA, T. S. de; COSTA NETO, A. O.; PINHEIRO, R. R. Sistemas de criação de ovinos e ocorrência de anticorpos contra o vírus da Maedi-Visna na microrregião de Juazeiro, BA. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 2, p. 342-353, abr./jun., 2010. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/41254/1/API-Sistemas-de-criacao.pdf>>. Acesso em: 8 dez. 2012.

MARTINEZ-NAVALON, B.; PERIS, C.; GOMEZ, E. A.; PERIS, B.; ROCHE, M. L.; CABALLERO, C.; GOYENA, E.; BERRIATUA, E. Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 311-317, Aug., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384438>>. Acesso em: 15 fev. 2013.

MELO, A. C. M.; FRANKE, C. R. Soroprevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) no rebanho de caprinos leiteiros da Grande Fortaleza, Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 113-117, jan./ mar., 1997.

OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. Paris: World Organization for Animal Health, 1996. p. 369-373.

PASICK, J. Maedi-Visna virus and Caprine Arthritis-Encephalitis virus: Distinct species ou *quasispecies* and its implications for laboratory diagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 241-244, Oct., 1998.

PAULA, N. R. O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J. F. S.; SOUSA, F. M. L.; SOUZA, K. C.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Parâmetros clínicos e hematológicos de reprodutores caprinos

infectados naturalmente pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina durante a transição da estação seca para chuvosa no Ceará. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 2, p.141-147, , abr./jun., 2008. Disponível em:<<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/534221/1/APIParametrosclinicosehematologicosdereprodutores.pdf>>. Acesso em: 5 fev. 2013.

PINHEIRO, R. R. Vírus da artrite encefalite caprina: desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará. 2001. 115 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal. Área de Concentração: Medicina Veteriária Preventiva e Epidemiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/59788/1/Tese-Raymundo-rizaldo-pinheiro.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; ARAGÃO, M. A. C.; MARTINEZ, P. M. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 133-137, jan./mar., 2010. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27610/1/NT-Avaliacao-de-antigenos-para-o-diagnostico-de.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

PINHEIRO, R. R.; BRITO, R. L. L.; RODRIGUES, A. S.; DIAS, R. P.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G. **Protocolo de Immunoblotting para diagnóstico da Artrite-Encefalite Caprina**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2011. 4 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 122). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/43727/1/UMT-COT-122.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F. Prevalência da infecção pelo vírus da Artrite-Encefalite Caprina no Estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 449-454, maio/jun., 2001. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/cr/v31n3/a14v31n3.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; YORINORI, E. H.; ANDRIOLI, A. Comparação de três técnicas de produção do lentivírus caprino utilizado no teste de imunodifusão em gel de ágar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 453-458, 2005. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/28359/1/API-Comparacao-de-tres-tecnicas-de-producao-do.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

PINHEIRO, R. R.; OLORTEGUI, C. D. C.; GOUVEIA, A. M. G.; ARAÚJO, S. C.; ANDRIOLI, A. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 101, p. 51-56, 2006. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/50037/1/API-Desenvolvimento-de-dot-blot.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

RICARTE, A. R. F.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; BÃO, S. N.; SILVA, J. S.; BRAZ, S. V.; NAME, K. P. O.; LIMA-VERDE, I. B.; BRITO, I. F.; DIAS, R. P.; AGUIAR, T. D. F.; DANTAS, T. V. M.; ARAÚJO, S. A. C.; CAVALCANTE, D. M. L. P.; PAULA, N. R. O.; TEIXEIRA, M. F. da S. Avaliação imunohistoquímica e ultra-estrutural de gametas e embriões caprinos infectados com o CAEV. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 2, p. 217-223, abr./jun., 2010. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27586/1/API-Avaliacao-imunohistoquimica-e-ultraestrutura.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

RODRIGUES, A. de S.; BRITO, R. L. L. de; SANTOS, V. W. S. dos; DIAS, R. P.; BRITO, I. F. de; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R. Comparação de dois testes sorológicos na evolução da infecção natural de caprinos leiteiros com o vírus da Artrite-Encefalite Caprina: dados preliminares¹. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 4.; FEIRA NACIONAL DO AGRONEGÓCIO DA CAPRINO-OVINOCULTURA DE CORTE, 3., 2009, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2009. 3 f. 1 CD-ROM. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/27633/1/AAC-Comparacao-de-dois-testes->

sorologicos-na-evolucao-da-infeccao-natural-de-caprinos-leiteiros-com-o-virus-da.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2012.

SIDER, L. H. ; BRITO, R.L.L. ; VERAS, A.K.A. ; RODRIGUES, A.S.; Souza, K.C. ; OLIVEIRA, E.L. ; ANDRIOLI, A. ; PINHEIRO, R. R. **Processamento de amostras provenientes do trato reprodutivo feminino para extração de RNA genômico do vírus da artrite-encefalite caprina e diagnóstico molecular por RT-nested PCR**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2010a. 5 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 117). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31705/1/UMT-Cot-117.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

SIDER, L. H.; OLIVEIRA, A.N.; VERAS, A. K. A.; KADRI, S. M.; FRANCO, M. M.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A. **Processamento sêmen para extração de RNA genômico do vírus da artrite-encefalite caprina e diagnóstico molecular por RT-nested PCR**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2010b. 8 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 113). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31689/1/UMT-Cot-113.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

SIDER, L. H.; VERAS, A.K.A.; OLIVEIRA, A.N.; BRITO, R.L.L.; ANDRIOLI, A.; RAVAZZOLO, A. P.; PINHEIRO, R. R.; SOUZA, R.B. **Processamento de sangue e líquido sinovial para extração de RNA genômico do vírus da artrite-encefalite caprina e diagnóstico molecular por RT-nested PCR**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2010. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 115). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31693/1/UMT-Cot-115.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

SIGURDARDÓTTIR, B.; THORMAR, H. Isolation of a viral agent from the lungs of sheep affected with Maedi. **The Journal of Infectious Diseases**, v.114, n. 1, p. 55-60, Feb.,1964.

SINGH, D.K., CHEBLOUNE, Y.; MSELLI-LAKHAL, L.; KARR, B.M.; NARAYAN, O. Ovine lentivirus-infected macrophages mediate productive infection in cell types that are not susceptible to infection with cell-free virus. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 6, p.1437-1444, 1999.

SOUSA, A. L. M. de; ARAÚJO, J. F.; AZEVEDO, D. A. A. de; SOUZA, T. S. de; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R. Titulação de lentivírus de pequenos ruminantes através do cultivo de células de membrana nictitante caprina. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS, 1., 2012, Sobral. **Resumos...** Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2012. p. 55-56. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Documentos, 104). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69069/1/rac-Titulacao-de-lentivirus.pdf>>. Acesso em: 9 dez. 2012.

SOUZA, T. S. de; PINHEIRO, R. R.; LIMA, C. C. V. de; COSTA, J. N. Transmissão interespecie dos lentivírus de pequenos ruminantes: revisão e desafios. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 6, n. 1, p. 23-34, 2012. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/83302/1/API-Transmissao-interespecie.pdf>>. Acesso em: 9 dez. 2012.

STRAUB, O.C. Maedi-Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p.1-5, Jan., 2004.

TURIN, L.; PISONI, G.; GIANNINO, M.L.; ANTONINI, M.; ROSATI, S.; RUFFO, G.; MORONI, P. Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. **Small Ruminant Research**, v. 57, n. 1, p. 73-79, Feb., 2005.

VAREA, R.; MONLEÓN, E.; PACHECO, C.; LUJÁN, L.; BOLEA, R.; VARGAS, M. A.; VAN EYNDE, G.; SAMAN, E.; DICKSON, L.; HARKISS, G.; AMORENA, B.; BADIOLA, J. J. Early detection of Maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 4, p. 301-30, Jul., 2001.